

**EFEK CHITOSAN PADA HISTOPATOLOGIS AORTA TIKUS PUTIH
YANG DIBERI PAKAN LEMAK TINGGI**

***Sri Isdadiyanto**

***Lab. Biologi Struktur dan Fungsi Hewan Jurusan Biologi FSM UNDIP**

ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the influence of chitosan on aorta histopatologic of Sprague Dawley rats induced by high fat ration. The animals for this study were twenty adult male rats divided into four groups, i.e. group I as the control was fed with basal ration containing normal fat for 3 months, group II was fed ration containing high fat for 3 months, group III was fed ration containing high fat and given chitosan 180 mg per kg body weight per day orally in 2 ml aquadest for 3 months, group IV was fed ration containing high fat for 3 months and after 1 month given chitosan 180 mg per kg body weight per day orally in 2 ml aquadest for 2 months. Each group consisted of five animals. After 90 days, the rats were necropsied and the aortas of heart were collected to histopathological. Histopathologic analysis of aortas using hematoxylin-eosin staining method and were analysis by descriptive. The rats given normal diet did not induce atheroma plaque. The rats given high fat diet induced atheroma plaque. The rats given high fat and given chitosan simultaneously did not induce atheroma plaque. The rats given high fat and after 1 month given chitosan 40% did not induce atheroma plaque and 60% induced atheroma plaque. Based on the result of this study, it was concluded that high fat ration was a major factor able to cause atherosclerosis and chitosan was able to prevent atheroma plaque formation.

Key words: Atherosclerosis, aorta, atheroma plaque, chitosan, high fat ration.

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian chitosan terhadap histopatologis aorta yang diberi lemak tinggi. Sebanyak 20 ekor tikus putih *Sprague Dawley* jantan dewasa digunakan sebagai hewan uji. Tikus putih dibagi menjadi empat kelompok lima ekor per kelompok. Kelompok I sebagai kontrol diberi pakan lemak normal. Kelompok II diberi pakan lemak tinggi. Kelompok III diberi lemak tinggi + chitosan 180 mg/ kg BB/ hari. Kelompok IV diberi lemak tinggi dan setelah satu bulan diberi chitosan 180 mg/ kg BB/ hari. Chitosan diberikan per oral dalam larutan 2 ml aquades. Penelitian dilakukan selama 90 hari. Pada hari terakhir perlakuan, hewan dikorbankan dan diambil aorta serta jantung untuk pembuatan preparat histopatologi. Pengamatan preparat histopatologis aorta dengan pewarnaan hematoksin-eosin dan dianalisis secara deskriptif. Aorta tikus putih yang diberi pakan lemak normal menunjukkan gambaran normal. Aorta tikus putih yang diberi pakan lemak tinggi menunjukkan gambaran plak atheroma. Aorta tikus putih yang diberi pakan lemak

tinggi dan diberi *chitosan* 180 mg/ kg BB/ hari menunjukkan gambaran normal. Aorta tikus putih yang diberi pakan lemak tinggi, kemudian setelah 1 bulan perlakuan, hewan tersebut juga diberi *chitosan* 180 mg/ kg BB/ hari, ada beberapa yang menunjukan gambaran normal dan gambaran plak ateroma. Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan, bahwa pakan lemak tinggi adalah faktor utama penyebab aterosklerosis dan chitosan dapat mencegah terjadinya plak ateroma.

Kata kunci: *Aterosklerosis, aorta, plak ateroma, chitosan, pakan lemak tinggi.*

PENDAHULUAN

Peningkatan kadar kolesterol akibat konsumsi lemak dalam jumlah tinggi terjadi karena lemak yang dikonsumsi sebagian akan diubah menjadi kolesterol. Lemak yang berasal dari sintesis lokal dan makanan, akan ditransportasikan ke hati. Lemak yang berasal dari sintesis lokal dibebaskan dan ditransportasikan ke hati dalam bentuk asam lemak bebas, sedangkan lemak dari makanan ditransportasikan dalam bentuk kilomikron (Mayes dan Botham, 2003). Schmidt dan Fagerberg (2008) menyatakan bahwa penyakit pada arteri dapat terjadi dengan peningkatan kadar kolesterol *low density lipoprotein* (LDL) dan *very low density lipoprotein* (VLDL) dalam darah (hiperkolesterol).

Aterosklerosis merupakan penyakit arterial yang ditandai dengan penebalan dinding arteri karena proliferasi sel otot polos tunika media, akumulasi lipid yang disertai dengan pembentukan jaringan fibrosa, kalsifikasi dan berhubungan dengan perubahan tunika intima (Ross, 1999). Aterosklerosis butuh waktu yang lama.

Williams *et al.*, (2002) melaporkan setelah enam bulan perlakuan pakan berkolesterol tinggi, terdapat perubahan struktur arteria yang ditandai dengan terbentuknya *plaque* yang mengandung jaringan fibrosa dan serabut elastin pada lumen arteria. *Plaque* ini terjadi karena akumulasi lipid pada dinding arteri yang akan mengikat jaringan fibrosa dan mengubah bentuk normal tunika intima (Stary *et al.*, 1995). Libby dan Theroux (2005) melaporkan bahwa kadar kolesterol LDL yang tinggi memicu penimbunan kolesterol di sel pembuluh darah, yang menyebabkan munculnya aterosklerosis dan terbentuknya *plaque* di dinding pembuluh darah.

Aterosklerosis merupakan penyebab kematian utama di negara berkembang dan melalui proses yang kompleks, melibatkan faktor genetik, faktor lingkungan dan berbagai tipe sel yang saling berpengaruh satu dengan yang lain. Lesi aterosklerotik diawali oleh adanya kerusakan sel-sel endotel pembuluh darah (Maturana *et al.*, 2007). Endotel bersifat antitrombogenik, yang mencegah

pembekuan darah. Bila sel-sel endotel rusak akibat lesi aterosklerotik, jaringan ikat subendotelium yang terpapar akan menginduksi penggumpalan trombosit darah. Penggumpalan trombosit mengawali sederetan kejadian yang menghasilkan fibrin dan fibrinogen darah. Selanjutnya terbentuk bekuan intravaskular, atau trombus yang dapat tumbuh membesar sehingga menimbulkan sumbatan total aliran darah setempat. Massa solid yang disebut emboli dapat terlepas dari trombus tersebut dan terbawa darah serta dapat menyumbat pembuluh darah di tempat lain. Pada kedua keadaan tersebut, aliran darah dapat berhenti, yakni suatu keadaan yang dapat membahayakan jiwa (Junqueira dan Carneiro, 2003).

Chitosan merupakan produk deasetilasi dari chitin yang ditemukan pada cangkang udang *Penaeus monodon* (Hargono *et al.*, 2008). Penelitian terakhir dilaporkan biopolimer alami chitosan disintesa dari jenis udang *Penaeus monodon* (Sewvandi dan Adikary, 2012). Chitosan merupakan turunan chitin, suatu amino polisakarida yang mengalami asetilasi, terdapat pada eksoskeleton dan kulit arthropoda termasuk insekta, ketam, dan udang (Vahouny *et al.*, 1983; Fan *et al.*, 2006). Chitosan merupakan polimer alami, tidak toksik, biokompatibel dan dapat dibiodegradasi (Hejazi dan Amiji, 2003). Chitosan dapat menangkap lemak di

lambung sebelum dimetabolisme (Maezaki *et al.*, 1993). Menurut Gallaher *et al.*, (2002) chitosan bermuatan positif dan mampu berikatan dengan molekul bermuatan negatif, seperti lemak dan garam empedu kemudian membentuk ikatan ionik. Lemak yang terikat oleh chitosan menjadi sebuah massa yang besar sehingga tidak dapat diabsorpsi dalam traktus digestivus. Isdadiyanto *et al.*, (2013) menyatakan chitosan dapat mencegah terbentuknya plak pada arteria koronaria.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian chitosan terhadap histopatologis aorta tikus putih yang diinduksi lemak tinggi. Manfaat penelitian ini untuk mencari bahan alternatif alami untuk mengatasi penyakit penyumbatan arteri yang disebabkan hiperlipidemia.

METODE PENELITIAN

Sebanyak 20 ekor tikus putih *Sprague Dawley* jantan, umur 1,5 bulan dipergunakan sebagai hewan uji. Tikus putih diadaptasikan selama seminggu dalam satu kandang satu ekor tikus diberi pakan standar (mengandung lemak normal 4,5%) dan minum secara *ad libitum*. Tikus putih dibagi menjadi empat kelompok masing-masing kelompok terdiri lima ekor. Kelompok I adalah kelompok kontrol, yaitu tikus putih yang diberi pakan mengandung lemak normal selama tiga bulan. Kelompok

II adalah kelompok tikus putih yang diberi pakan lemak tinggi (mengandung lemak 20%) selama tiga bulan. Kelompok III adalah kelompok tikus putih yang diberi pakan mengandung lemak tinggi dan diberi chitosan 180 mg/ kg BB/ hari dalam 2 ml aquades selama tiga bulan. Kelompok IV adalah tikus putih diberi pakan lemak tinggi selama tiga bulan, setelah satu bulan pertama, hewan tersebut juga diberi chitosan 180 mg/ kg BB/ hari dalam 2 ml aquades selama dua bulan. Chitosan asal cangkang udang laut (*Penaeus monodon*) diberikan per oral dengan bantuan spuit injeksi 2,5 ml berkanula. Pada hari terakhir perlakuan, hewan dikorbankan nyawanya dan aorta serta jantung diambil kemudian dimasukkan dalam botol film yang berisi 10% *neutral buffered formalin* untuk pembuatan preparat histopatologi.

Pembuatan Preparat Histopatologi

Preparat histopatologi arteri koroner dibuat dengan metode parafin dan fiksatif yang digunakan adalah larutan 10% *neutral buffered formalin*. Tahapan yang dilakukan setelah proses fiksasi adalah melakukan pemotongan tipis jaringan setebal kurang lebih 4 mm dengan orientasi sesuai dengan organ yang akan dipotong (*trimming*). Pisau yang digunakan untuk *trimming* adalah pisau skalpel No. 22-24. Jumlah potongan jaringan yang dapat dimuat dalam *embedding cassette* berkisar

antara 1-5 buah disesuaikan dengan ukuran organ. Dehidrasi jaringan dilakukan setelah *trimming* menggunakan *tissue processor* (Leica, Germany), ini dimaksudkan untuk mengeluarkan air yang terkandung dalam jaringan dengan menggunakan cairan dehidran seperti etanol atau iso propyl alkohol. Cairan dehidran kemudian dibersihkan dari dalam jaringan dengan menggunakan reagen pembersih (*clearing agent*) yaitu xylol. Reagen pembersih ini akan diganti dengan parafin dengan cara dimasukkan dalam larutan parafin cair sehingga parafin terpenetrasi ke dalam jaringan; proses ini disebut impregnasi. Parafin yang digunakan mempunyai titik cair 56-58°C. Pengaturan waktu dehidrasi pada *tissue processor* diberikan pada pada Tabel 1. Setelah melalui proses dehidrasi, jaringan yang berada di dalam *embedding cassette* dipindahkan ke dalam *base mold*, kemudian diisi dengan parafin cair dan dilekatkan pada *embedding cassette* yang disebut blok. Jaringan dalam blok yang telah dingin, selanjutnya dipotong pada ketebalan irisan 4 μ m dengan *rotary microtome*. Irisan tersebut ditempel pada gelas objek yang sebelumnya diolesi *Mayer's egg albumin* dan ditetesi aquades kemudian dibiarkan kering pada suhu kamar. Untuk selanjutnya setelah preparat mikroanotomi kering dilakukan pewarnaan dengan metode pewarnaan Hematoxylin Ehrlich-Eosin, kemudian dilakukan

mounting dengan meneteskan entelan secukupnya dan ditutup dengan *coverglass*. Pengamatan preparat pada setiap perlakuan dilakukan dengan mikroskop cahaya untuk mengamati histopatologis aorta antar kelompok perlakuan.

Tabel 1. Pengaturan waktu dehidrasi pada *tissue processor*

Proses	Cairan	Waktu
Dehidrasi	Alkohol 80%	2 jam
	Alkohol 95%	2 jam
	Alkohol 95%	1 jam
	Alkohol absolut	1 jam
	Alkohol absolut	1 jam
	Alkohol absolut	1 jam
Clearing	Xylol	1 jam
	Xylol	1 jam
	Xylol	1 jam
Impregnasi	Parafin	2 jam
	Parafin	2 jam
	Parafin	2 jam

Analisis Data

Pewarnaan preparat mikroanotomi dengan metode pewarnaan Hematoxylin Ehrlich-Eosin Analisis, kemudian pengamatan histopatologis aorta dilakukan secara deskriptif untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan.

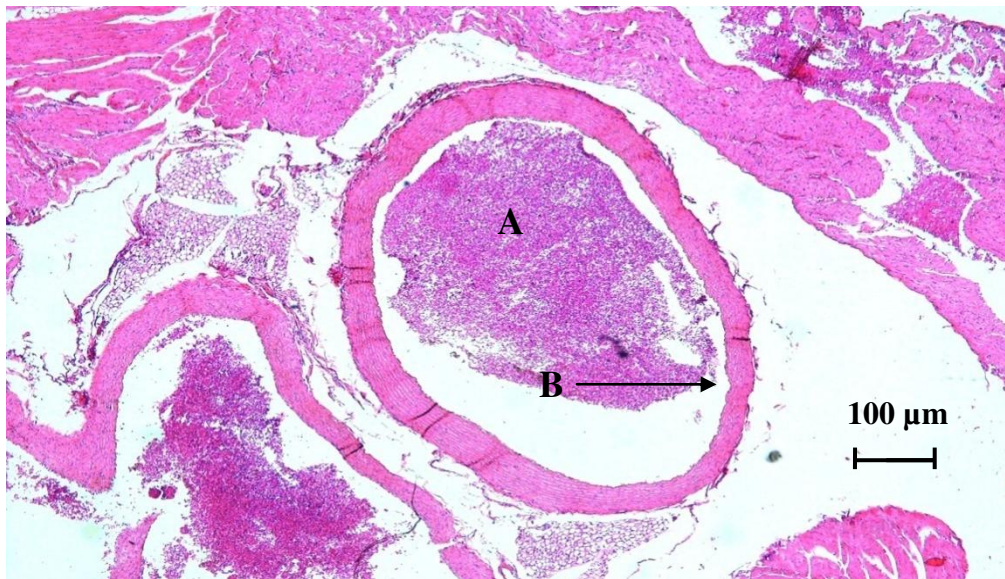
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan dengan mikroskop cahaya preparat histopatologis aorta tikus putih *Sprague Dawley* setelah perlakuan pakan selama 90 hari dengan pewarnaan hematoksilin-eosin secara lengkap disajikan pada Tabel 2 dan Gambar 1- 6.

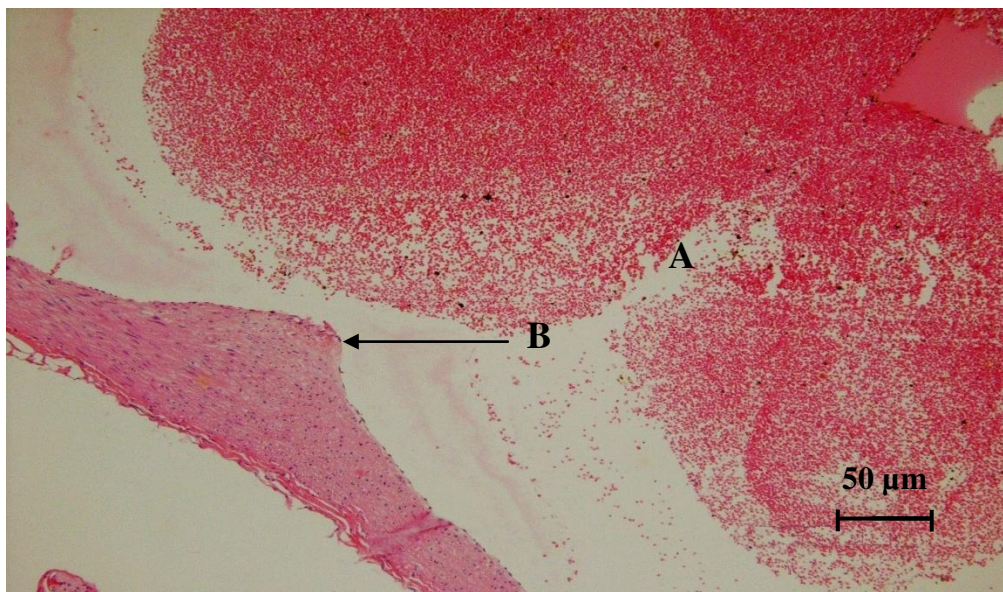
Tabel 2. Hasil pengamatan dengan mikroskop cahaya preparat histopatologis aorta dengan pewarnaan hematoksilin-eosin

Gambaran histopatologis aorta				
No.	K	K1	K2	K3
1.	Normal	Aterosklerosis	Normal	Normal
2.	Normal	Aterosklerosis	Normal	Normal
3.	Normal	Aterosklerosis	Normal	Aterosklerosis
4.	Normal	Aterosklerosis	Normal	Aterosklerosis
5.	Normal	Aterosklerosis	Normal	Aterosklerosis

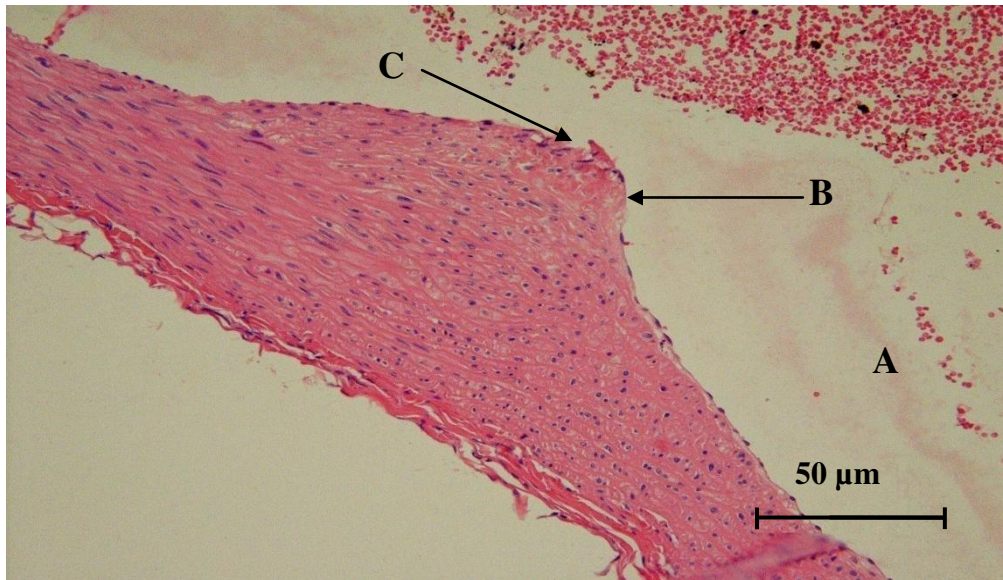
Keterangan: K = Kontrol, K1 = Pakan lemak tinggi, K2 = Pakan lemak tinggi + *chitosan*, K3 = Pakan lemak tinggi + *chitosan* setelah satu bulan.



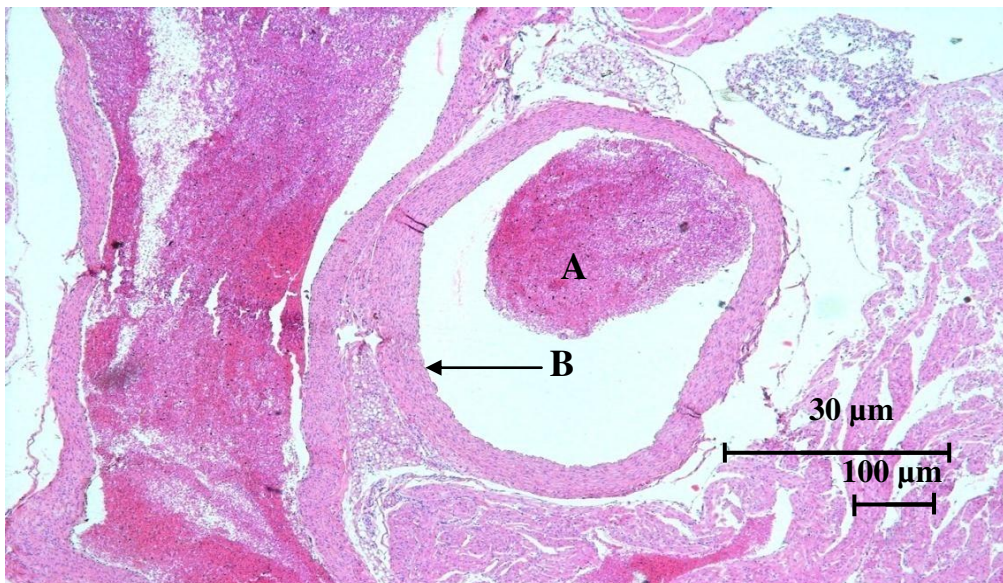
Gambar 1. Gambaran histopatologis aorta tikus putih yang diberi pakan normal (K) selama 90 hari. Aorta tampak normal. Lumen aorta (A) dan Dinding aorta (B) (Hematoksilin dan eosin, 100x.).



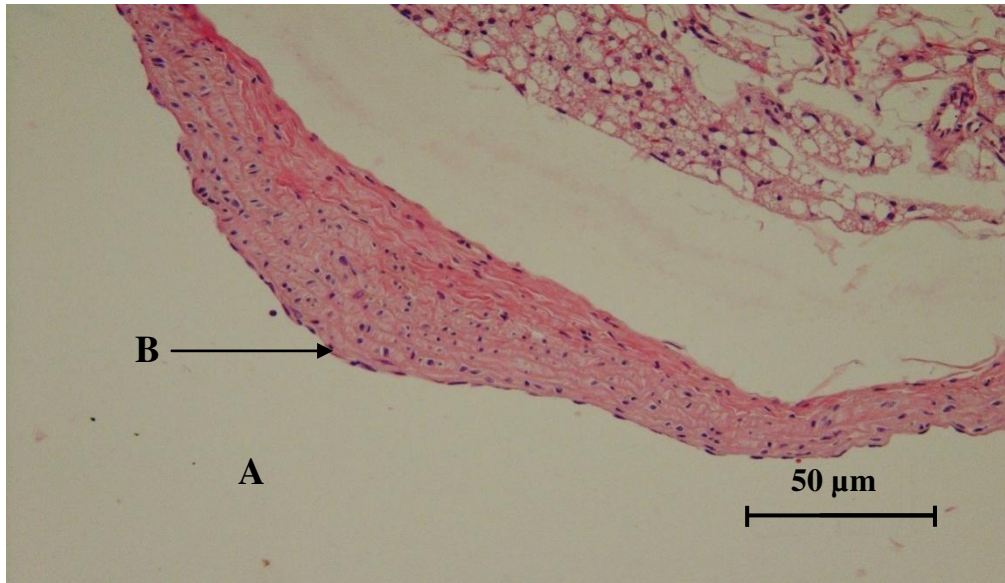
Gambar 2. Gambaran histopatologis aorta tikus putih yang diberi pakan lemak tinggi (K1) selama 90 hari. Pada aorta terlihat plak ateroma. Lumen aorta (A) dan Plak ateroma (B) (Hematoksilin dan eosin, 250x.).



Gambar 3. Gambaran histopatologis aorta tikus putih yang diberi pakan lemak tinggi (K1) selama 90 hari. Pada aorta terlihat plak ateroma. Lumen aorta (A), Plak ateroma (B) dan Ruptur (C) (Hematoksilin dan eosin, 500x.).



Gambar 4. Gambaran histopatologis aorta tikus putih yang diberi pakan lemak tinggi dan diberi *chitosan* 180 mg/ kg BB/ hari (K2) selama 90 hari. Aorta tampak normal (tidak terbentuk plak ateroma). Lumen aorta (A) dan dinding aorta (B) (Hematoksilin dan eosin, 100x.).



Gambar 5. Gambaran histopatologis aorta tikus putih yang diberi pakan lemak tinggi selama 90 hari, kemudian setelah 1 bulan perlakuan, hewan tersebut juga diberi *chitosan* 180 mg/ kg BB/ hari (K3). Pada aorta terlihat plak ateroma. Lumen aorta (A) dan Plak ateroma (B) (Hematoksilin dan eosin, 500x.).



Gambar 6. Gambaran histopatologis aorta tikus putih yang diberi pakan lemak tinggi selama 90 hari, kemudian setelah 1 bulan perlakuan, hewan tersebut juga diberi *chitosan* 180 mg/ kg BB/ hari (K3). Pada aorta terlihat plak ateroma. Lumen aorta (A), Plak ateroma (B), sel-sel endotelial (C), Tunika intima (D), Tunika media (E) dan Tunika adventisia (F) (Hematoksilin dan eosin, 1000x.).

Pengamatan dengan mikroskop cahaya preparat histopatologis aorta terlihat dinding aorta terdiri dari sel-sel endotelia dan tiga tunika berturut-turut dari bagian dalam ke arah luar yaitu tunika intima, tunika media dan tunika adventisia (Gambar 6). Aorta tikus putih yang diberi pakan normal (K) terlihat normal. Aorta tikus putih yang diberi pakan lemak tinggi (K1) menunjukkan gambaran plak ateroma, tunika media terjadi penebalan dan proliferasi sel ditandai adanya inti sel yang berbentuk bulat besar, terjadi nekrosis dan terlihat adanya ruptur pada sel-sel endotelia (Gambar 3). Aorta tikus putih yang diberi pakan lemak tinggi dan diberi *chitosan* 180 mg/ kg BB/ hari (K2) menunjukkan gambaran normal (Gambar 4), seperti halnya gambaran histopatologis aorta tikus putih yang diberi pakan normal (K). Hal ini menunjukkan bahwa *chitosan* mampu menurunkan kondisi hiperlipidemia dengan sempurna sehingga tidak terbentuk plak ateroma. Aorta tikus putih yang diberi pakan lemak tinggi, kemudian setelah 1 bulan perlakuan, hewan tersebut juga diberi *chitosan* 180 mg/ kg BB/ hari (K3), ada beberapa yang menunjukkan gambaran normal dan gambaran plak ateroma, hal ini berarti *chitosan* belum dapat menurunkan kondisi hiperlipidemia dengan sempurna sehingga masih terbentuk plak ateroma. Kelompok perlakuan (K3) ada beberapa yang tidak terbentuk plak ateroma, hal ini

dapat terjadi kemungkinan ada beda kepekaan individual (tikus) terhadap histopatogenesis ateroma.

Xu *et al.*, (2007), melaporkan bahwa kadar kolesterol plasma menurun pada tikus yang diberi *chitosan*, meskipun mekanismenya belum jelas. Menurut Elleuch *et al.*, (2011), beberapa bahan pangan yang tidak terserap seperti serat bahan pangan (*dietary fiber*) dapat ikut menurunkan kadar kolesterol dalam darah. Lebih lanjut dikatakan bahwa serat bahan pangan dibutuhkan pada proses pengubahan kolesterol menjadi garam empedu. Menurut Hargono *et al.*, (2008) menjelaskan bahwa *chitosan* bila dimakan dapat dianggap suatu serat bahan pangan (*dietary fiber*). Isdadiyanto *et al.*, (2013) menyatakan *chitosan* dapat mencegah terbentuknya plak pada arteria koronaria. Lebih lanjut Wolever *et al.*, (1997) melaporkan bahwa paling sedikit ada empat mekanisme penurunan kolesterol oleh serat bahan pangan yaitu: pengikatan asam empedu di dalam usus halus yang menyebabkan meningkatnya ekskresi asam empedu fekal; penurunan absorpsi lemak dan kolesterol; penurunan laju absorpsi karbohidrat yang menyebabkan penurunan kadar insulin serum sehingga menurunkan rangsangan sintesis kolesterol dan lipoprotein; dan penghambatan sintesis kolesterol oleh asam lemak rantai pendek yang dihasilkan dari fermentasi serat larut di dalam kolon.

Terbentuknya plak ateroma pada penelitian ini menandakan telah terjadi disfungsi endotel, hal ini sependapat dengan Maturana *et al.*, (2007) bahwa disfungsi endotel merupakan kejadian awal dari perkembangan aterosklerosis. Pada kelompok II menunjukkan bahwa pakan lemak tinggi menyebabkan hiperlipidemia sehingga memicu terbentuknya plak ateroma pada arteri koroner, hasil senada dilaporkan oleh Ross (1999) bahwa hiperlipidemia dalam jangka panjang dapat menyebabkan aterosklerosis. Aterosklerosis merupakan penyakit arterial yang ditandai dengan penebalan secara parsial atau menyeluruh dinding pembuluh darah karena akumulasi lipid yang disertai dengan pembentukan jaringan fibrosa, kalsifikasi yang berhubungan dengan perubahan tunika intima. Menurut Libby dan Theroux (2005), kadar kolesterol LDL yang tinggi, memicu penimbunan kolesterol di sel pembuluh darah, yang menyebabkan munculnya aterosklerosis dan terbentuknya plak di dinding pembuluh darah.

Menurut Lewis *et al.*, (2004) plak yang terbentuk lama-kelamaan terus tumbuh ke dalam lumen sehingga diameter lumen menyempit. Penyempitan lumen mengganggu aliran darah ke distal dari tempat penyumbatan terjadi. Bila ukuran sumbatan meningkat, penyempitan arteri koroner dapat membentuk sirkulasi

kolateral, pembuluh darah yang membentuk jalur aliran darah di sekitar penyumbatan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan, bahwa pakan lemak tinggi adalah faktor utama penyebab aterosklerosis dan chitosan dapat mencegah terjadinya plak ateroma.

SARAN

Dari hasil penelitian ini, perlu dilakukan penelitian lanjutan yaitu: Penelitian mengenai aterosklerosis dengan waktu pemberian pakan lemak tinggi yang lebih lama, sehingga didapatkan gambaran histopatologis aterosklerotik yang lebih lengkap dan penelitian yang menjelaskan tentang mekanisme chitosan dalam pencegahan terbentuknya plak ateroma.

DAFTAR PUSTAKA

- Elleuch M, Bedigian D, Roissex O, Besbes S, Blecker C, Attia H. 2011. Dietary fibre and fibre-rich by product of food processing: Characterizations, technological functionality and commercial application: A review. *Food Chem.* 124: 411-421.
- Fan D, Zhu X, Xu M, Yan J. 2006. Adsorption properties of Chromium by chitosan coated montmorillonite. *J Biol Sci* 6:941-945.
- Gallaher DD, Gallaher CM, Mahrt GJ, Carr TP, Hollingshead CH, Heslink Jr. R, Wise J. 2002. A glucomannan and chitosan fiber supplement decreases plasma cholesterol excretion in

- overweight normocholesterolemic humans. *J Am Coll Nutr* 21: 428-433.
- Hargono, Abdullah, Sumantri I. 2008. Production of chitosan is made of the *Penaeus monodon* shell waste and application to serum cholesterol reduction. *Reaktor*. 12:53-57.
- Hejazi R, Amiji M. 2003. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 89: 151-165.
- Isdadiyanto, S. Moeljopawiro, S, Puniawati, N. dan Wuryastuty H. 2013. Chitosan Mempertipis dinding dan Memperbesar Diameter Lumen Arteri Koroner Tikus Putih yang Diberi Lemak Tinggi. *Journal Veteriner*. 14:310-316.
- Junquiera LC, Carneiro J. 2003. *Basic Histology: Text & Atlas*. 10 Edition. London. The McGraw-Hill Companies. Inc. Pp. 203-218.
- Lewis R, Gaffin D, Hoefnagels M, Parker B. 2004. *Life fifth edition*. London. McGraw Hill Book Company. Inc. 699-703.
- Libby P, Theroux P. 2005. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*. 111:3481-3488.
- Maezaki YK, Tsuji Y, Nakagawa Y, Kawai T, Tsugita W, Takekawa A, Terada H, Hara, Mitsuoka T. 1993. Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males. *Biochi Biotech and Biochem* 57: 1439-1444.
- Maturana MA, Irigoyen MC, Spritzer PM. 2007. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: Current concepts. *Clinic Version Impresa*. 62: 1807-5932. Sao Paulo.
- Mayes PA, Botham KM. 2003. *Cholesterol Synthesis, Transport, and Excretion. Harper's Illustrated Biochemistry*, 26nd edition. London. Mc.Graw Hill, 219-227.
- Ross R. 1999. Atherosclerosis An Inflammatory Disease. *N E J M* 340: 115-126.
- Schmidt C, Fagerberg B. 2008. Apo B/apoA-1 ratio is related to femoral artery plaques in 64-year-old women also in cases with low LDL cholesterol. *Atherosclerosis*. 196: 817-822.
- Sewvandi GA, Adikary SU. 2012. Synthesizing and characterization of natural biopolymer chitosan derived from shrimp type, *Penaeus monodon*. *Tropical Agricultural Research*. 23:272-276.
- Stary HC, Chandler A, Dinsmore BRE, Fuster V, Glagov S, Insull Jr. W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. 1995. A definition of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. *Circulation*. 92: 1355-1374
- Vahouny GV, Connors WE, Subramanian S, Lin DS, Gallo LL. 1983. Comparative lymphatic absorption of sitosterol, stigmasterol, fucosterol and differential inhibition of cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr* 33: 576-589.
- Williams HJ, Johnson L, Carson KGS, Jackson CL. 2002. Characteristics of intact and ruptured atherosclerotic plaques in brachiocephalic arteries of apolipoprotein E knockout mice. *ATVB Journal*. 22:788-795.
- Wolever TMS, Hegele RA, Connelly PW, Ranson TPP, Story JA, Furumoto EJ, Jenkins DJA. 1997. Long-term effect of soluble-fiber foods on postprandial fat metabolism in dyslipidemic with E3 and apo E4 genotypes. *Am J Nutr* 66:584-590.

Wuryastuty H, Wasito R, Raharjo S. 1995. Peroxidation index: Methods and diagnostic value. *A Reseach Report University Research for Graduate Education*. Directorate General of Higher Education, Jakarta, Indonesia.

Xu G, Huang X, Qiu L, Wu J. 2007. Mechanism study of chitosan on lipid metabolism in hyperlipidemic rats. *Asia Pac J Clin* 16: 313-317.